

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003426

International filing date: 23 December 2004 (23.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0101406
Filing date: 31 December 2003 (31.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0101406 호
Application Number 10-2003-0101406

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 31일
Date of Application DEC 31, 2003

출 원 인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

2005 년 1 월 10 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.31
【발명의 명칭】	암치료 및 예방을 위한 계피 및 대추 추출물
【발명의 영문명칭】	EXTRACTS OF CINNAMON AND ZIZYPHUS ZUZUBA FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF CANCERS
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-029927-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권병목
【성명의 영문표기】	KWON,Byoung-Mog
【주민등록번호】	560202-1074413
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 하나아파트 110동 1506호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손광희
【성명의 영문표기】	SON,Kwang-Hee
【주민등록번호】	590113-1009529
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 101동 1303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한동초
【성명의 영문표기】	HAN,Dong Choi
【주민등록번호】	610626-1163011

【우편번호】	305-762
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 401동 1401호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고영희
【성명의 영문표기】	KHO,Young-Hee
【주민등록번호】	450420-1025011
【우편번호】	302-170
【주소】	대전광역시 서구 갈마동 동산아파트 4동 1004호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	전효곤
【성명의 영문표기】	CHUN,Hyo-Kon
【주민등록번호】	600217-1829314
【우편번호】	305-330
【주소】	대전광역시 유성구 지족동 열매마을 대우아파트
	308-1702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김환묵
【성명의 영문표기】	KIM,Hwan Mook
【주민등록번호】	591224-1024118
【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 133동 1301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이창우
【성명의 영문표기】	LEE,Chang Woo
【주민등록번호】	690814-1351618
【우편번호】	306-803
【주소】	대전광역시 대덕구 덕암동 8-16 부길 빌라 나동 102호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 7 면 7,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 6 항 301,000 원

【합계】 337,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 168,500 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 암치료 및 예방을 위한 계피 및 대추 추출물에 관한 것으로, 구체적으로 계피 추출물과 대추 추출물을 포함하는 암치료 및 예방용 약학적 조성물 및 기능성 식품에 관한 것이다. 상기 조성물은 각각의 구성성분에 의한 세포 사멸 및 암세포 이동을 억제하는 효과를 가지고 있으며, 또한 구성성분의 혼합에 의해 암세포 성장억제 효과가 상승하는 특성을 나타내고 있으며, 천연물에서 추출함으로써 독성이 없어 우수한 효능을 가진 안전한 항암제로 사용할 수 있다. 또한, 이를 암 치료 및 예방을 위한 기능성 식품으로 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

계피, 대추, 항암제, 기능성 식품.

【명세서】

【발명의 명칭】

암치료 및 예방을 위한 계피 및 대추 추출물{EXTRACTS OF CINNAMON AND ZIZYPHUS ZUZUBA FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF CANCERS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 화학식 1의 화합물에 의한 DNA 절단을 나타낸 전기영동사진이며,

도 2는 본 발명의 화학식 1의 화합물에 의한 PARP (poly ADP-ribose polymerase)의 절단을 나타낸 웨스턴 블랏 (western blot) 분석사진이며,

도 3은 본 발명의 화학식 1의 화합물에 의한 암세포 이동억제를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 본 발명은 암치료 및 예방을 위한 추출물 조성물에 관한 것이다.

<5> 암이란 주로 통제되지 않는 세포의 증식에서 시작되어 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장 장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아

갈 수 있는 질환 군을 총칭한다. 지난 10여년 동안 암을 정복하기 위해 세포주기나 세포사멸 (apoptosis)의 조절과 발암유전자나 암억제 유전자들을 포함한 새로운 표적을 모색함에 있어서 눈에 띄는 발전을 거듭해 왔음에도 불구하고 암의 발생률은 문명이 발달됨에 따라 증가되고 있다.

<6> 현재, 암환자의 치료법은 외과적 수술, 방사선 치료, 40여종의 강한 세포독성을 보이는 항암물질 투여에 의한 화학요법에 의존하고 있는 상태인데, 이들 치료법도 대부분 조기 암환자나 특정 암에만 국한되어 암으로 인한 사망은 계속 증가하고 있는 추세이다.

<7> 항암물질 투여에 의한 화학요법은 고환암이나 백혈병 치료에 성공적으로 사용되고 있다. 그러나, 유방암, 대장암, 폐암의 경우와 같은 일반적인 상피세포유래 암의 치료에는 화학적 치료법이 효과적이지 못한 경우가 많다. 그의 주요 원인은 암세포가 여러 항암제에 저항성을 획득함으로써 항암제의 사용이 매우 제한적으로 되기 때문이다.

<8> 현재 사용 중인 대부분의 항암제 경우, 암세포가 정상세포보다 빨리 분열한다는 사실에 바탕을 두고 개발된 것으로, DNA의 복제나 합성을 억제하는 성질의 화합물들 (cyclophosphamide, cisplatin, doxorubicin), 대사 억제제들 (methotrexate, 5-fluorouracil), 세포분열 억제제 (vincristine), 핵산 유사물 (6-mercaptopurine), topoisomerase 억제제 (etoposide)들 이다. 따라서 항암제는 일반적으로 암세포의 분열과 생존에 영향을 미친다. 상술한 바와 같이, 기존의 항암

제가 암세포가 빨리 분열한다는 데에 초점을 맞추고 있어서 일반적인 독성이 문제가 되고 있다. 대표적인 것이 체모가 빠지는 증상 등이다. 또한 정상적으로 빨리 분열하는 정상의 골수세포와 내장의 상피세포에 영향을 준다는 단점이 있다. 그러므로 독성이 적은 항암제의 개발은 인류가 가지고 있는 숙제 중에 하나이다.

<9> 한편, 항암제의 암세포에 대한 작용은 암세포의 사멸, 암세포 이동, 암전이의 3가지 측면으로 구분하여 살펴볼 수 있다.

<10> **(1) 세포사멸**

<11> 다세포 생물의 모든 세포는 세포사멸이 유도될 수 있는 잠재력을 갖고 있으며, 세포의 성장과 세포의 사멸에 의해 항상성이 유지된다. 성인에 있어 하루에 500억에서 700억 개의 세포가 세포사멸의 과정에 의해 제거되며, 유사한 수의 세포가 생성됨으로써 항상성이 유지되는 것이다. 세포사멸을 겪는 세포는 주위의 세포에 의해 대식 과정을 거쳐 흡수된다. 정상적으로 세포사멸은 암세포의 제거, 자가활성의 백혈구 제거 및 발생과정의 조직 생성 등에 관여한다. 그러나 암세포의 경우 세포사멸에 관련된 신호전달에 결함을 갖게 됨으로써, 암세포의 숫자가 증가할 뿐만 아니라, 항암제 저항성까지도 갖게 된다.

<12> 세포의 사멸에 관련된 중요한 단백질들은 동물의 진화과정 중에도 보존되어왔으며 이는 바이러스에 의한 약탈에 표적이 되기도 하였다. 진화과정 중에 보존된 단백질들은 세포사멸경로에 핵심인자들로서 caspase/CED-3, Apaf-1/CED-4 및 Bcl-2/CED-9이 이에 해당한다.

<13> 세포의 사멸의 시작은 크게 두 가지로 분류된다. 하나는 세포막에 존재하는 세포사멸 신호수용체에 의한 신호기전이고, 나머지 하나는 세포 내에 존재하는 미토콘드리아에 의한 신호기전이다.

<14> 세포사멸 신호수용체는 암괴사인자 수용체 (tumour-necrosis factor receptor)의 집단으로 세포내의 사멸부위 (death domain)에 의해 특징된다. 사멸부위는 FADD (fas-associated death domain protein)라는 단백질과 결합하고, FADD는 비활성 caspase-8 및 caspase-10과 결합하여 자가 분해에 의해 활성화된 caspase가 된다.

<15> 아직 잘 밝혀지지 않은 미토콘드리아에 의한 신호기전은 미토콘드리아 막에 영향을 주어 cytochrome c (시토크롬 C) 및 다른 사멸인자들의 방출에 의해 시작된다. 세포질 내에서 cytochrome c는 APAF1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP 및 procaspase-9과 결합하여, caspase-9을 활성화시킨다. 초기 caspase (caspase-8, -9, 10)가 활성화되면, 실행 caspase (caspase-3, -6, -7)을 활성화시킨다. 활성화된 caspase들은 다른 비활성 caspase들을 분해함으로써 세포사멸 기전을 증폭하게 된다. 궁극적으로 활성화된 실행 caspase들은 세포사멸 기질들을 분해함으로써, 사멸세포의 형태 및 생화학적 특성을 나타내게 된다. 대표적인 세포사멸 기질들은 다음과 같다. Lamins의 분해는 핵의 수축을 유도하고, PARP (poly ADP-ribose polymerase)의 분해는 외부 스트레스에 의해 손상된 DNA의 복구를 억제하여 세포가 사멸되도록 한다. 또한 세포의 actin과 같은 세포 골격 단백질들을 분해하여 세포가 수축되어 대식세포에 의해 제거되도록 한다.

<16> 발암유전자, DNA 손상, 저산소증, 저영양소증과 같은 내적인 stress는 세포의 사멸을 유발하며, p53가 중요한 조절인자로 알려졌다. p53는 세포사멸을 촉진하는

Bax, Bak, PUMA, Noxa 등의 발현을 촉진함으로써, 생존인자인 Bcl-2의 활성을 억제함으로써 사멸을 유도한다. 암세포의 경우 내적인 세포사멸경로에 결함을 갖고 있는 경우가 매우 높다. 예를 들어, 인간의 암의 50% 이상의 경우, p53 암억제 유전자가 돌연변이된 형태로 존재함으로서, 암세포의 사멸은 억제되어 있다. 또한 p53의 하류에 있는 매개체 (PTEN, Bax, Bak, Apaf-1)에 결함이 있는 경우 및 p53의 상류에 있는 조절인자 (ATM, Chk2, Mdm2, p19ARF)의 결함도 보고 되었으며, 이러한 결함은 p53가 세포사멸을 유도하는 작용을 억제하게 된다[Nature Review drug Discovery 2002, 1, 111-121].

(2) 세포의 이동

세포의 이동은 동물의 발생, 면역방어 과정 등에 필수적인 정상적인 세포활성으로, 병리학적 관점에서는 암세포 전이, 상처치유, 동맥경화, 염증 등에 관여한다. 암세포의 전이는 암세포가 초기의 위치에서 세포간질을 지나 혈관으로 이동하는 전이과정, 제 2의 표적 조직에서 혈관 밖으로 이동할 때, 그리고 신생혈관 형성시 혈관 내피세포의 이동에 관여하는 다양한 기능을 갖고 있다.

세포의 이동은 매우 복잡한 다단계 과정들에 의해 조절되는 생명현상 이고, 세포의 이동 과정은 수많은 단계들에 의한 수많은 단백질들이 관여하며, 수많은 신호전달물질들에 의해 조절되는 매우 복잡한 생물학적 현상이다. 대표적인 단백질로는 인테그린 (integrin) 및 세포성장인자 수용체 등이며 이들 단백질들은 인산화 효소에 의해서 인산화 되어 세포의 성장, 분화, 사멸 및 이동을 조절하는 것으로 알려져 왔다.

세포이동을 조절하는 물질은 암, 관절염 등의 치료제로 개발가능성이 높다[Nature Review Molecular and Cell Biology, 2003, 4, 700-711].

<20> **(3) 암전이**

<21> 암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포가 전이되는 성질 때문이다.

실제로 암은 어떤 부위에 발생하든지 생성 부위만 찾으면 외과적 수술에 의해 간단하게 제거될 수 있는데, 이러한 외과적 수술의 한계는 암세포가 원발부위 이외의 여러 다른 곳으로 퍼져 나가기 때문에 초기 시기에만 수술을 통한 완치를 기대할 수 있다. 암세포는 무절제하게 성장 할 뿐만 아니라 이웃장기로 쉽게 전이되기 때문에 인간의 생명을 위협하는 가장 위험한 질환이다.

<22> 암의 전이과정은 전이성 암세포가 최초발생부위에서 이탈하여 주변조직으로 침윤하여 다른 부위에서의 증식에 의해 2차 종양을 형성하게 되는 일련의 과정에 의해 이루어진다. 즉, 전이 과정은 이동, 접착, 침윤의 세 가지 주요 단계로 구성되며, 첫 번째 단계에서 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)를 포함한 여러 금속단백분해효소들은 암세포가 세포외기질 (extracellular matrix, ECM) 과 기저막 (basement membrane, BM)을 분해하여 암세포의 침윤을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 두 번째 단계는 MMPs는 세포외기질과 기저막 성분의 분해에 관여하는 분비형 또는 막통과형 효소의 일군으로 구조와 기능적 특성에 따라 기저막의 콜라겐을 분

해하는 콜라겐나제와 프로테오글라이칸, 당단백질 등을 분해하는 스트로멜라이신 (stromelysin), 기저막의 콜라겐과 젤라틴을 분해하는 젤라틴나제, 그리고 막형 membrane type MMP (MT-MMP) 등 크게 4개의 군이 존재하며, 최근 콜라겐나제-3 및 4개의 MT-MMP를 포함하여 17 종류가 분리 확인 되었다. 특히, 이들 효소 중 MMP-2와 MMP-9는 기저막의 주성분인 IV형 콜라겐을 분해하는 효소로서 B16-F10과 같은 고전 이성 암세포주에서 과다 분비되는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 암세포의 생육이나 전이의 동물실험 모델에 있어서 MMP-2 및 MMP-9의 암세포전이 억제 표적 효소로서의 중요성이 평가됨에 따라 이 효소들의 저해제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[Nature Review Cancer 2001, 1, 46-54].

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

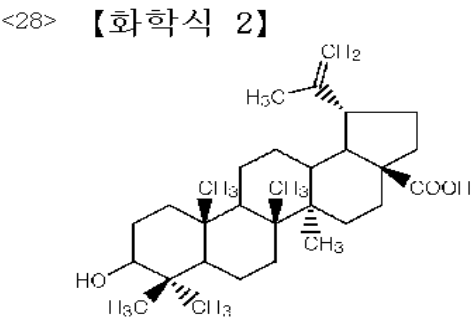
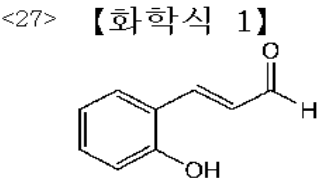
<23> 본 발명의 목적은 독성이 없으며 암세포 성장 억제효과를 갖는 천연 추출물들로 이루어진 약학적 조성물 및 기능성 식품을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<24> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 계피 추출물과 대추 추출물을 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<25> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<26> 본 발명은 하기 화학식 1을 함유하는 계피 추출물과 하기 화학식 2를 함유하는 대추 추출물을 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.



<29> 상기 계피 추출물은 쇠절된 계피를 에탄올을 이용하여 추출한 후 염기성 수용액을 첨가하여 염을 형성시키고, 이후 에틸 아세테이트를 이용하여 추출한 후 감압 농축하여 얻어진다. 상기 사용되는 염기성 수용액의 일례로, 수산화나트륨을 사용하며, 염을 형성시킨 후 이를 중화하기 위해 산 수용액을 사용한다. 이렇게 얻어진 계피 추출물은 상기 화학식 1의 2'-히드록시신남알데히드 (2'-hydroxycinnamaldehyde, HCA)를 약 50 % 이상 포함한다. 상기 계피 추출물은 대장암, 유방암을 포함하는 대부분의 암세포의 세포 사멸을 유도하고 암세포의 이동을 억제할 뿐만 아니라 천연물로부터 얻어져 독성이 없어 안전하게 사용할 수 있다.

<30> 또한 상기 대추 추출물은 쇠절된 대추과육을 메탄올을 이용하여 환류추출한 후 염기성 수용액을 첨가하여 염을 형성시키고, 이후 에틸 아세테이트를 이용하여 추출

한 후 감압 농축하여 얻어진다. 상기 사용되는 염기성 수용액의 일례로, 수산화나트륨을 사용하며, 염을 형성시킨 후 이를 중화하기 위해 산 수용액을 사용한다. 이렇게 얻어진 대추 추출물은 상기 화학식 2의 베틀린산(betulinic acid, BTA)을 50 % 이상 포함한다. 상기 대추 추출물은 암세포 전이 억제에 효과가 있으며, 또한 천연물로부터 얻어져 독성이 없는 것으로 안전하게 사용할 수 있다.

<31> 본 발명은 계피 추출물과 대추 추출물을 혼합하여 항암제로 사용한다. 상술한 바와 같이, 계피 추출물과 대추 추출물은 각각에 대해 항암효과를 가지고 있으나, 이를 혼합하여 사용하는 경우, 암세포의 세포사멸 유도 및 암전이 효과를 나타낼 뿐만 아니라 암세포 성장억제 효과가 단독으로 사용하는 것보다 더욱 우수하게 나타난다. 또한, 각각의 추출물이 독성이 없어 안전한 항암제로 사용할 수 있다.

<32> 상기 계피 추출물과 대추 추출물의 혼합비는 무게비로 20:80~80:20 %로서, 상기 범위는 혼합에 의해 상승효과가 나타나는 범위로서, 상기 범위를 벗어난 경우, 각각의 추출물의 효과가 나타나 혼합에 의한 상승효과를 얻을 수 없다.

<33> 상기 추출물 조성물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의

부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<34> 또한, 상기 추출물 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 100~1000 mg/일이며, 바람직하게는 100~500 mg/일이며, 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

<35> 또한, 본 발명은 상기 계피 추출물과 대추 추출물의 혼합물을 유효성분으로 하는 암 예방 및 치료를 위한 기능성 식품을 제공한다.

<36> 본 발명의 계피 추출물과 대추 추출물의 혼합물은 상술한 바와 같이, 암세포

의 세포사멸 유도 및 암전이 효과를 나타낼 뿐만 아니라 암세포 성장억제 효과가 각각에 대해 사용하는 것보다 더욱 우수하게 나타나며, 또한 각각의 추출물이 독성이 없어 암 예방 및 치료를 위한 기능성 식품으로 사용할 수 있다.

<37> 본 발명의 기능성 식품은 현탁액 및 음료수 등 통상적인 식품으로 제조하여 사용할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 통상적인 식품의 첨가물을 모두 함유하며, 상기 첨가물에 항생 활성을 가진 본 발명의 추출물의 혼합물을 첨가하여 기능성 식품을 제조한다. 이때, 첨가되는 함량은 맛, 촉감 및 소비자의 성향을 고려하여 적절히 선택할 수 있으며, 전체 기능성 식품의 0.001~10(중량%)가 바람직하다.

<38> 또한, 본 발명의 기능성 식품은 음료수 또는 현탁제로 제조할 수 있으며, 상기 추출물의 혼합물 외에 비타민 C, 분말비타민 E, 젖산철, 산화아연, 니코틴산아민, 비타민 A, 비타민 B₁, 비타민 B₂ 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 물질과 같이 음료에 통상적으로 첨가하는 성분들을 포함할 수 있다.

<39> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

<40> 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<41> <제조예 1> 계피 추출물의 제조

- <42> 한약제상에서 구입한 계피 1 kg를 쇠절하고, 100% 헥산으로 24 시간 동안 추출하고 여과하여 기름성분의 물질을 제거하였다.
- <43> 기름성분의 물질을 제거한 계피를 70% 에탄올로 3일 동안 추출한 후 여과하여 에탄올 추출액을 얻었다. 상기 에탄올 추출액을 60℃의 수조에서 감압 농축한 후 얻어진 농축액을 2 L 증류수에 현탁하였다. 상기 증류수에 현탁시킨 에탄올 추출물은 0.1 노르말 수산화나트륨 적당량을 가하여 염을 생성한 후 2 L에틸아세테이트를 가하여 액상층을 분리한 후 분별깔때기를 이용하여 가용부를 제거하였다. 상기 용액을 0.1 노르말 염산으로 중화시킨 후 2 L의 에틸아세테이트 첨가하고 진탕추출하였다. 얻어진 추출액을 40℃의 수조에서 감압 농축하여 계피 추출물을 얻었다.
- <44> 상기 계피 추출물을 80% 메탄올 수용액을 용출용매로 이용하는 ODS 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 활성물질인 HCA가 50% 이상 존재함을 확인하였다.
- <45> <제조예 2> 대추 추출물의 제조
- <46> 생약시장에서 채취한 대추과육 1 kg를 쇠절하고 100% 메탄올로 24 시간 동안 환류추출하여 감압여과한 후 그 여액을 60℃의 수조에서 감압농축하여 얻어진 메탄올 농축액을 2 L의 증류수에 현탁하였다. 증류수에 현탁시킨 메탄올 추출물에 0.1 노르말 수산화나트륨 적당량을 가하여 산성화합물에 대한 염을 생성하고 얻어진 용액에 2 L 에틸아세테이트를 첨가하고, 진탕 추출하여 에틸아세테이트 가용부를 제거하였다. 얻어진 용액을 0.1 노르말 염산으로 중화시킨 후 2 L의 에틸아세테이트를 첨가하고

진탕추출하였다. 얻어진 추출액을 60℃의 수조에서 감압농축하여 대추 추출물을 얻었다.

<47> 에틸아세테이트 추출액은 40ml의 메타놀에 용해시킨 후 역상 실리카겔에서 분획하여 60% 아세토니트릴 수용액 분획과 70% 아세토니트릴 수용액 분획을 얻었다. 상기 분획을 70% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 이용하는 ODS 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 활성물질인 베틀리닌 산이 50%이상으로 함유한 대추추출물을 얻었다.

<48> <실시에 1> 본 발명의 추출물의 제조

<49> 상기 제조 예 1에서 얻어진 계피 추출물 50 mg과 상기 제조예 2에서 얻어진 대추 추출물 50 mg을 상온에서 혼합 및 교반하여 본 발명의 추출물 조성물을 제조하였다.

<50> <실험예 1> 2'-히드록시신남알데히드 (HCA) 처리에 의한 세포사멸 유도 측정

<51> MDA-MB-231 유방암 세포 및 SW620 대장암 세포를 100mm 세포배양접시에 각각 1×10^6 및 2×10^6 씩 접종하였다. 18시간 후 HCA 화합물을 각각 10 μ M 및 30 μ M 씩 처리하여 48시간 동안 배양하였다.

<52> 이후 HCA에 의한 DNA 절단을 분석하기 위해 처리된 세포를 용해하였다. 이때 용해액으로는 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA,

1% NP-40, 1 mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 및 0.05% Sodium deoxy sulfate)를 사용하였다. 세포용해액은 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층 세포액을 회수하였다. 회수된 상층세포액에 페놀을 처리하여 단백질을 제거하고 핵산층을 회수하였다. 50 mM이 되도록 potassium acetate를 첨가하고, 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하여 핵산을 침전시켰다. 침전된 핵산은 80% 에탄올 용액으로 세척한 후 건조하였다. 건조된 핵산은 30 μ l의 TE buffer로 녹인 후 DNase가 제거된 RNase를 37°C에서 1시간 처리하여 RNA를 제거하였다.

<53> 이렇게 준비된 핵산용액은 한천 겔 (1.5%)을 이용하여 전기영동으로 분리하여 조각으로 절단된 DNA를 확인하였다.

<54> 결과는 도 1에 나타내었다.

<55> 도 1에서 보는 바와 같이, HCA가 처리된 MDA-MB-231 세포 및 SW620 세포는 DMSO가 처리된 세포와 비교할 때, chromosomal DNA가 규칙적인 크기의 DNA 단편으로 절단되었다. 이러한 DNA 단편화는 세포사멸의 특성으로, HCA가 암세포의 사멸을 유발함을 의미한다. positive control로서는 UV를 사용하였다. 세포를 UV에 15분 노출시켰을 때 chromosomal DNA에 손상이 유발되어 세포사멸이 유발되었다.

<56> 따라서 HCA는 암세포의 사멸을 유도함을 알 수 있다.

<57> <실험에 2> HCA 처리에 의한 PARP의 절단 측정

<58> MDA-MB-231 유방암 세포 및 SW620 대장암 세포를 100mm 세포배양접시에 각각 1×10^6 및 2×10^6 씩 접종하였다. 18시간 후 HCA를 각각 10 μ M 및 30 μ M 씩 처리하여 48시간 동안 배양하였다.

<59> HCA에 의한 PARP 절단을 분석하기 위해 처리된 세포를 용해시켰다. 이때 용해액으로는 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 및 0.05% Sodium deoxy sulfate)를 사용하였다. 세포 용해액은 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층 세포액을 회수하였다. 회수된 세포액은 Bradford reagent (Bio-Rad Protein Assay, USA)를 이용하여, 단백질 농도를 측정하였다. 30 μ g의 세포 용해액은 7.5% SDS-FAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 단백질을 분리한 후, PVDF membrane으로 단백질을 전기이동한 후 TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% 탈지분유를 이용하여 blocking 하였다. 세포내의 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)는 PARP 특이 항체 (Cell signaling Technology, USA), HRP (horse radish peroxidase가 연결된 2차 항체, 및 chemiluminence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 검출하였다.

<60> 결과는 도 2에 나타내었다.

<61> 도 2에서 보는 바와 같이, HCA가 처리된 MDA-MB-231 세포 및 SW620 세포는 DMSO가 처리된 세포와 비교할 때, 정상적인 PARP 단백질 (116 kDa)의 양이 감소되었고, 절단된 형태의 PARP 단백질 (89 kDa)의 양은 증가되었다. PARP는 DNA의 손상을 복구하는 효소로서, 세포사멸이 유도되었을 때, PARP의 분해가 caspase-3에 의해 일어난다. 따라서 HCA는 caspase-3를 매개한 암세포의 사멸을 유도함을 알 수 있다.

<62> <실험에 3> 암세포 이동억제 실험

<63> MDA-MB231 유방암 세포를 배양접시에서 trypsin/EDTA (Gifco, USA) 용액을 이용하여 분리한 후, trypsin inhibitor (0.5mg/ml) (Sigma, USA)를 이용하여 중화시키고, 세포배양 배지를 이용하여 두 번 세척하였다. Hematocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였다. Boyden chamber의 하단부 각각의 구멍에 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M의 HCA를 넣고 polycarbonate membrane (8 μ m pore) (Neuro Probe, Inc, USA)로 덮은 후, Boyden chamber 상단부를 조립하고 상단부 각각의 구멍에 준비된 MDA-MB-231 세포를 6×10^5 썩 접종하여 세포배양기 내에서 6시간 동안 반응시킨 후, membrane을 메탄올에 담가 세포를 고정하였다. 세포가 고정된 membrane을 공기중에서 건조한 후 10% Gimmsa staing (Sigma, USA) 용액에서 1시간 반응시킨 후, 물로 10초간 destaining 하였다. 이때, 이동하지 않은 세포 (membrane의 위쪽)는 면봉을 이용하여 제거한 후, 현미경을 이용하여, 이동된 세포 (membrane의 아래쪽)의 수를 측정하였다.

<64> 결과는 도 3에 나타내었다.

<65> 도 3에서 보는 바와 같이, HCA는 5 μ M부터 세포이동을 억제하며, 30 μ M에서는 세포의 이동을 50%이상 억제함을 확인하였다.

<66> <실험에 4> 대추추출물에 의한 B16-F10 흑색종양의 폐암전이 억제실험

<67> 소혈청 (FBS) 4%를 함유한 RPMI1640 배지에서 계대배양한 B16-F10 암세포주는 병냉생리 식염수로 2회 세척한 후 치사량 5×10^6 cell/mouse에 해당하는 세포현탁액

0.2ml씩 각 마우스의 꼬리정맥에 주사하였다. 시료의 투여는 시료를 주사용 식염수에 용해시켜 암세포이식 직후부터 매일 0.2ml씩, 부분 정제된 추출물의 경우 100mg/kg/일 의 농도로 15회 연속하여 경구 투여하였으며, 대조군은 주사용 식염수 0.2ml로 하였다. 항암효과의 평가는 암세포 이식 15 일 후 마우스의 가슴을 절개하고 폐를 적출한 후 형성된 종양을 계산하였다.

<68> 상기의 방법으로 실험한 결과 베틀리닌산을 주성분으로 하는 대추추출물 100mg/kg/일로 경구 투여한 처리군에 있어서 흑색종양세포의 폐전이율은 대조군을 100%로 하였을 때 비하여 60% 억제되었다.

<69> <실험예 5> 계피추출물과 대추추출물 조성물의 항암효과 측정

<70> 시료는 0.5% tween 80을 매체로 하여 조제하였으며, 실험군은 용매대조군 (0.5% tween80), 계피 추출물 (66 mg/kg)과 계피 및 대추추출 혼합물 (100 mg/kg)의 세 가지의 시료를 준비하였다. 적용 암세포주는 인체 대장암 세포주인 SW620을 사용하였고, 암세포는 1×10^7 cells/mL의 농도로 mouse 당 0.3 mL 씩 피하로 이식하였다. 약물은 암세포를 이식한 다음날 (day 1)부터 21일째까지 10 mL/kg의 액량으로 매일 1회 경구 투여하였다. 암세포 이식 후 8일째부터 22일째까지 총 6회 종양의 크기를 개체별로 측정하였다. 체중 변화는 첫날부터 최종일까지 총 8회 측정하였다. 암세포 이식 후 22일째에 nude mouse을 희생시켜 종양을 분리하고 무게를 측정하였다.

<71> 암세포 이식 nude 마우스에 경구 경로로 21일간 매일 공동 처리한 결과 체중의 감소는 없었으며, 종양 크기 변화에 있어서는 계피추출물을 단독으로 투여한 경우 용

매 대조군과 비교하여 각각 32.6% ($p<0.05$) 암세포성장억제 효과가 있었다. 계피와 대추추출 혼합물인 경우 51.8% ($p<0.01$)의 종양 성장 억제 효과가 관찰되었다. 종양 이식 후 22일째 SW620 종양을 절제하여 그 무게를 측정한 결과 용매대조군과 비교하여 계피추출물을 단독으로 투여한 경우와 계피와 대추추출 혼합물인 경우 각각 26.1% ($p<0.05$) 및 46.2% ($p<0.01$)의 통계적으로 유의한 무게감소가 나타났다.

<72> <실험에 6> 계피추출물 및 대추추출물의 래트에 대한 경구투여 급성 독성실험

<73> 본 발명의 계피추출물과 대추 추출물의 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<74> 6주령의 특정병원체부재 (specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 2마리씩의 동물에 본 발명의 계피 추출물과 대추 추출물을 각각 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 현탁하여 1회 단회 경구투여 하였다. 시험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 시행하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

<75> 그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 계피 추출물과 대추 추출물 각각은 랫트에서는 1000 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않으며, 경구 투여 최소치사량 (LD_{50})은 랫트에서는 1000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

<76> <제제예 1> 캡슐제의 제조방법

<77> 본 발명의 추출물 10 mg을 락토오스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

<78> 상기 분말 및 캡슐제의 구성성분은 다음과 같다.

<79> 실시예 1의 화합물10.0 mg

<80> 락토오스14.8 mg

<81> 폴리비닐 피롤리돈.....10.0 mg

<82> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

<83> <제제예 2> 주사액제의 제조방법

<84> 본 발명의 추출물 10 mg, 만니톨 180 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg 및 증류수 2974 mg을 함유시켜 주사제를 제조하였다. 상기 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

<85> 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.

<86> 실시예 1의 화합물 10 mg

<87> 만니톨180 mg

<88> $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

<89> 증류수 2974 mg

<90> <제제예 3> 음료의 제조방법

<91> 본 발명의 추출물, 비타민 C, 분말비타민 E, 젖산철, 산화아연,
니코틴산아미드, 비타민 A, 비타민 B₁ 및 비타민 B₂를 잘 혼합하여 제조하였다.

<92> 상기 음료의 구성성분은 다음과 같다.

<93> 본 발명의 추출물 0.1 g

<94> 비타민 C 15 g

<95> 분말비타민 E 7.5 g

<96> 젖산철 19.75 g

<97> 산화아연 3.5 g

<98> 니코틴산아미드 3.5 g

<99> 비타민 A 0.2 g

<100> 비타민 B₁ 0.25 g

<101> 비타민 B₂ 0.3 g

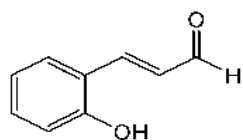
【발명의 효과】

<102> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 계피 추출물 및 대추추출물의 혼합으로 이루어진 조성물은 각각의 구성성분에 의한 세포 사멸 및 암세포 이동을 억제하는 효과

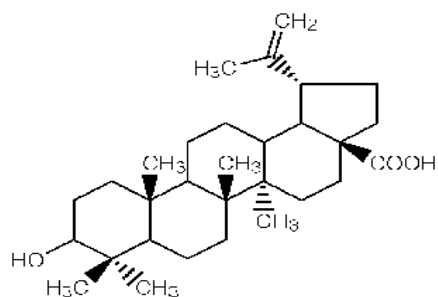
를 가지고 있으며, 또한 구성성분의 혼합에 의해 암세포 성장억제효과가 상승하는 특성을 나타내고 있으며, 천연물에서 추출함으로써 독성이 없어 우수한 효능을 가진 안전한 항암제로 사용할 수 있다. 또한, 이를 암 치료 및 예방을 위한 기능성 식품으로 사용할 수 있다.

【청구항 1】

화학식 1



화학식 2



29-26

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 대추 추출물을 쇠절된 대추과육을 메탄올을 이용하여 환류추출한 후 염기성 수용액을 첨가하여 염을 형성시키고, 이후 에틸 아세테이트를 이용하여 추출한 후 감압 농축하여 얻어진 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 계피 추출물과 대추 추출물의 혼합비가 무게비로 20:80 ~ 80:20 %인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 암 예방 및 치료용 약학적 조성물이 암세포 성장 억제, 세포 사멸 유도 및 암 전이 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

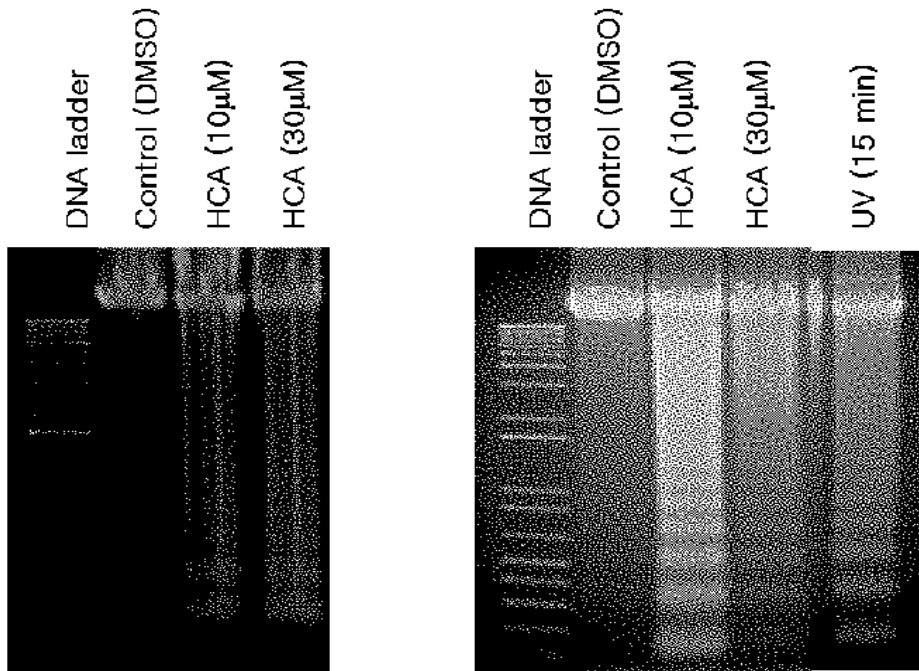
제 1항의 계피 추출물과 대추 추출물의 혼합물을 유효성분으로 암 예방 및 치료용 기능성 식품.

【도면】

【도 1】

MDA-MB-231

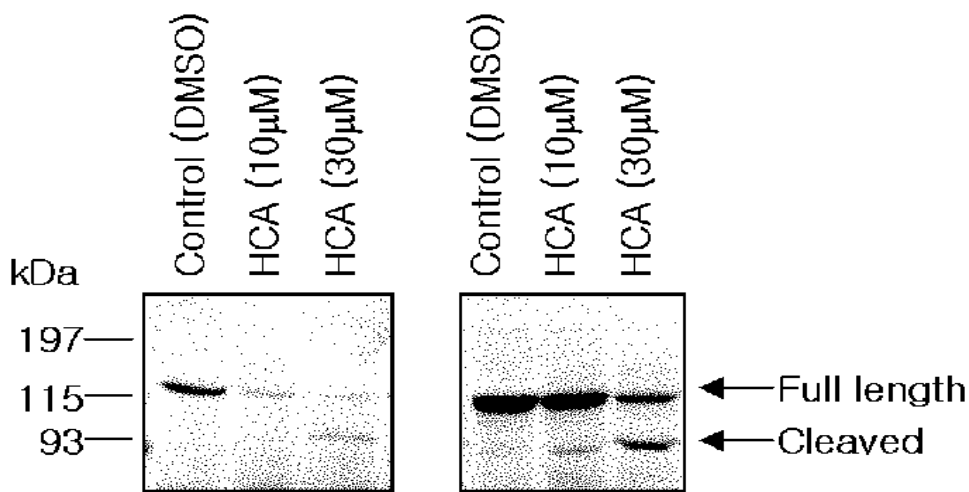
SW620



【도 2】

MDA-MB-231

SW620



blot:PARP

【도 3】

